



**Escola Superior d'Agricultura
de Barcelona**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

**Efecte de la profunditat d'enterrament de llavors de
Digitaria sanguinalis en l'emergència de plàntules i en la
susceptibilitat a la infecció per carbó**

Treball de final de grau
Enginyeria de Sistemes Biològics

Autora: Rosa Reverter i Prades

Tutora: Maite Mas i Serra

Castelldefels, Setembre 2018

Resum

El present estudi es fonamenta en la idea que *Ustilago syntherismae* pot ser útil per controlar les poblacions de *Digitaria sanguinalis*. Els objectius van ser estudiar la influència de diferents variables en la infecció; la mida de les espiguetes (gran / petita), la profunditat d'enterrament (1 cm / 3 cm), la cohort i el patró de germinació que seguien (radicular / coleoptilar).

El procediment seguit va comportar la realització de dos estudis. En el primer, realitzat en plaques de Petri, no es va tenir en compte la profunditat d'enterrament ni la cohort. En el segon, realitzat en testos, la profunditat d'enterrament i la cohort eren variables a tenir en compte i no ho va ser el patró de germinació.

L'estudi es va realitzar en diferents fases; la primera centrada en el mètode d'infiltració al buit de *U. syntherismae* a *D. sanguinalis*, seguida d'una fase de sembra de les espiguetes, la fase següent va ser la tinció i com a darrera fase l'observació.

Els resultats del primer assaig van permetre constatar amb un nivell de significació del 0,05 que la mida de les llavors influïa en la infecció, essent més alta en espiguetes petites que en grans. De la mateixa manera, es va rebutjar la influència del patró de germinació.

En el segon assaig, tot i no haver pogut obtenir dades suficients per veure com influïen les diferents variables estudiades en la infecció, es va poder observar com la profunditat d'enterrament, la infiltració i la mida de les llavors condicionaven la germinació de les espiguetes i l'emergència de les plàntules. En aquest cas, també amb un nivell de significació del 0,05, es va poder evidenciar que la profunditat d'enterrament tenia un efecte important tant en la germinació de les espiguetes com en l'emergència de les llavors. La variable mida no va mostrar diferències significatives en el grau d'infecció de les plàntules. D'altra banda, hi va haver indicis que la infiltració produïa un efecte negatiu en la germinació de les espiguetes i l'emergència de les plàntules.

Paraules clau: *Digitaria sanguinalis*, *Ustilago syntherismae*, forcadella, mala herba, espigueta, carbó.

Resumen

El presente estudio se basa en la idea que *Ustilago syntherismae* puede ser útil para controlar las poblaciones de *Digitaria sanguinalis*. Los objetivos fueron estudiar la influencia de diferentes variables en la infección; el tamaño de las espiguillas (grande / pequeño), la profundidad de enterramiento (1 cm / 3 cm), la cohorte y el patrón de germinación que seguían (radicular / coleoptilar).

El procedimiento seguido comportó la realización de dos estudios. En el primero, realizado en placas de Petri, no se tuvo en cuenta la profundidad de enterramiento ni la cohorte. En el segundo, realizado en tiestos, la profundidad de enterramiento y la cohorte eran variables a tener en cuenta, y no lo fue el patrón de germinación. Otra de las diferencias entre los dos estudios fue la consideración del patrón de germinación.

El estudio se realizó en diferentes fases; la primera centrada en el método de infiltración al vacío de *U. syntherismae* a *D. sanguinalis*, seguida de una fase de siembra de las espiguillas, la fase siguiente fue la tinción y cómo última fase la observación.

Los resultados obtenidos en el primer ensayo permitieron constatar con un nivel de significación del 0,05 que el tamaño de las semillas influía en la infección, siendo más alta en las espiguillas pequeñas que en las grandes. De la misma forma, se rechazó la influencia del patrón de germinación.

En el segundo ensayo, pese a no haber podido obtener datos suficientes para ver como influían las diferentes variables estudiadas en la infección, se pudo observar cómo la profundidad de enterramiento, la infiltración y el tamaño de las semillas condicionaban la germinación de las espiguillas y la emergencia de las plántulas. En este caso, también con un nivel de significación del 0,05, se pudo evidenciar que la profundidad de enterramiento tenía un efecto importante tanto en la germinación de las espiguillas como en la emergencia de las semillas. La variable tamaño no mostró diferencias significativas en el grado de infección de las plántulas. Por otro lado, hubo indicios que la infiltración producía un efecto negativo en la germinación de las espiguillas y emergencia de las plántulas.

Palabras clave: *Digitaria sanguinalis*, *Ustilago syntherismae*, garranchuelo, mala hierba, espiguilla, carbón.

Abstract

The present study is based on the idea that *Ustilago syntherismae* may be useful to control the population of *Digitaria sanguinalis*. Our aim was to check the influence of several variables in the infection; the size of the spikelets (big /small), the burying depth (1 cm / 3 cm), the cohort and the pattern of germination that they follow (radicular / coleoptilar).

The followed process implied carrying two studies. In the first, done in Petri dishes, the burying depth was not considered nor the cohort. In the second, done in pots, burying depth and cohort were variables to be taken into account, but the germination pattern was not.

The study was carried out in different phases; the first focused on the vacuum infiltration method from *U. syntherismae* to *D. sanguinalis*, followed by the planting phase of the spikelets, the next phase was staining, with observation as the final phase.

The results of the first test allowed for the confirmation with a level of relevance of 0.05 that the size of the seeds influenced the infection, being higher in small spikelets rather than in big ones. Similarly, the influence of the germination pattern was rejected.

In the second test, in spite of not achieving sufficient data to check how the different variables under study had any influence on the infection, it could be note how the burying depth, the infiltration and the size of the seeds conditioned the germination of the spikelets and the seeding emergence. In this case, also with a level of relevance of 0.05, that the burying depth had an important effect both on the germination and the seeding emergence could be demonstrated. The variable of size did not show any significant differences in the degree of infection of the seeds. On the other hand, there was some evidence that infiltration had a negative effect on the germination of the spikelets and the seeding emergence.

Key words: *Digitaria sanguinalis*, *Ustilago syntherismae*, hairy crabgrass, hairy finger-grass, spikelet

Índex

Índex de figures	6
Índex de taules	8
1. Introducció.....	9
1.1. Antecedents	9
1.2. <i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	9
1.2.1. Posició taxonòmica, noms comuns i nomenclatura.....	9
1.2.2. Característiques morfològiques	10
1.2.3. Cicle de vida i hàbitat	10
1.2.4. Patró de germinació	10
1.2.5. Profunditat i emergència de <i>Digitaria sanguinalis</i>	11
1.3. <i>Ustilago syntherismae</i>	12
1.3.1. Posició taxonòmica, noms comuns i nomenclatura.....	12
1.3.2. Característiques morfològiques	12
1.4. Interacció <i>Digitaria sanguinalis</i> – <i>Ustilago syntherismae</i>	12
1.4.1. Infecció	12
1.4.2. Grau d'afectació del fong a la planta.....	13
1.4.3. Distribució del fong dins la planta.....	14
1.4.4. Control biològic de la mala herba.....	14
2. Objectius	16
3. Materials i mètodes	17
3.1. Material biològic.....	17
3.1.1. Material vegetal	17
3.1.2. Material fúngic	17
3.1.3. Terra.....	17
3.2. Assaig A.....	17
3.2.1. Preparació material vegetal	18
3.2.2. Inoculació al buit	18
3.2.3. Preparació material fúngic.....	19
3.2.4. Disseny experimental	19
3.2.5. Tinció.....	20
3.2.6. Observació	22
3.2.7. Tractament de dades de l'assaig A	23
3.2.7.1. Estudi de la germinació	23
3.2.7.2. Estudi de la infecció	23

3.3. Assaig B	23
3.3.1. Disseny experimental	24
3.3.2. Reg.....	26
3.3.3. Tinció.....	27
3.3.4. Observació i recompte de les plàntules no emergides	28
3.3.5. Tractament de dades de l'assaig B	29
3.3.5.1. Estudi de la germinació	29
3.3.5.2. Estudi de la infecció	29
4. Resultats i discussió.....	30
4.1. Seguiment de la germinació de l'assaig A	30
4.2. Dades d'infecció de l'assaig A	32
4.2.1. Resultats obtinguts.....	32
4.2.2. Anàlisi de la variància	34
4.3. Seguiment de la germinació de l'assaig B	35
4.4. Anàlisi de la variància de l'assaig B	41
4.5. Dades infecció de l'assaig B	41
4.5.1. Resultats obtinguts.....	41
5. Conclusions.....	43
6. Bibliografia	44

Índex de figures

Figura 1. Desenvolupament d'una plàntula de <i>Digitaria sanguinalis</i> segons el patró de germinació (Verdú & Mas, 2014).	11
Figura 2. a: plàntules de l'assaig A de <i>D. sanguinalis</i> inoculades amb <i>U. syntherismae</i> després de ser destapades (es pot observar l'elongació del mesocòtil). b: plàntules després d'haver passat deu dies a la cambra de germinació. (Autora: Rosa Reverter).	20
Figura 3. a: cossis amb plàntules de <i>D. sanguinalis</i> preparades per l'observació i amb NaOH al 5% tapades amb un vidre i situades sobre la placa calefactora. b: cossis amb aigua destil·lada i cossis amb blau de toluídina contenint plàntules de <i>D. sanguinalis</i> . (Autora: Rosa Reverter).	21
Figura 4. Cossis amb aigua destil·lada que contenen les plàntules de <i>D. sanguinalis</i> i cossis amb blau de toluídina a sota. (Autora: Rosa Reverter).	21
Figura 5. Preparacions de <i>D. sanguinalis</i> . (Autora: Rosa Reverter).	22
Figura 6. Disposició de les espiguetes en els testos en l'assaig B. Es poden apreciar les separacions que delimitaven les zones on es trobaven les espiguetes amb les diferents mides i les diferents profunditats on s'havien enterrat. (Autora: Rosa Reverter).	25
Figura 7. Disposició de les safates que contenen els testos amb les espiguetes de <i>D. sanguinalis</i> en la cambra de germinació en l'assaig B. (Autora: Rosa Reverter).	26
Figura 8. Primera plàntula que va germinar i emergir en l'assaig B (data de germinació 21-02-2018). b: Primera plàntula que va germinar en el moment en què es va realitzar l'observació per veure si tenia fong o no (13-03-2018). (Autora: Rosa Reverter).	27
Figura 9. a: Plàntula sencera del grup control de <i>D. sanguinalis</i> abans de ser processada. b: Preparacions de <i>D. sanguinalis</i> ja tenyides preparades per l'observació al microscopi. (Autora: Rosa Reverter).	28
Figura 10. Percentatge de germinació acumulada d'espiguetes de <i>D. sanguinalis</i> al llarg del temps. 30	
Figura 11. Percentatge de germinació acumulada d'espiguetes de <i>D. sanguinalis</i> al llarg del temps segons el patró de germinació (Radicular o coleoptilar).	31
Figura 12. Percentatge de germinació acumulada d'espiguetes de <i>D. sanguinalis</i> al llarg del temps segons la mida de la llavor (gran o petita).	31
Figura 13. Plàntula de <i>D. sanguinalis</i> no infectada. Es poden observar els teixits vasculars del mesocòtil. imatge realitzada a 100 augments. (Autora: Rosa Reverter).	33
Figura 14. a: plàntula de <i>D. sanguinalis</i> infectada amb <i>U. syntherismae</i> . S'hi observen les hifes del fong tenyides amb blau fosc. Imatge realitzada a 400 augments. b: plàntula de <i>D. sanguinalis</i> infectada amb <i>U. syntherismae</i> . Es poden veure les hifes tenyides de color blau fosc associades als teixits vasculars del mesocòtil. Imatge realitzada a 400 augments. (Autora: Rosa Reverter).	33

- Figura 15.** a: plàntula de *D. sanguinalis* infectada amb un fong diferent a *U. syntherismae*. Imatge realitzada a 100 augments. b: plàntula de *D. sanguinalis* infectada amb un fong diferent a *U. syntherismae* (mateixa plàntula). Imatge realitzada a 400 augments. (Autora: Rosa Reverter)...34
- Figura 16.** Número de plàntules que van emergir en cadascuna de les cohorts.35
- Figura 17.** Percentatge mitjà d'espiguetes germinades i plàntules emergides (LGE), espiguetes germinades i plàntules no emergides (LGNE) i espiguetes no germinades (LNG). Les línies verticals corresponen a la desviació estàndard.36
- Figura 18.** a: imatge on es pot veure una plàntula de *D. sanguinalis*, provinent d'una espigueta petita situada a 3 cm de profunditat realitzada el 6-03-2018. b: imatge on es pot observar que la plàntula que havia emergit ja no hi és, fotografia realitzada el 14-03-2018. (Autora: Rosa Reverter).....37
- Figura 19.** Percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG, segons la mida de l'espigueta i representació mitjançant línies verticals de la desviació estàndard.38
- Figura 20.** Percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG, segons la profunditat d'enterrament de les espiguetes i les línies verticals que corresponen a la desviació estàndard.39
- Figura 21.** Percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG segons si les espiguetes estaven infiltrades amb *U. syntherismae* o no i representació mitjançant línies verticals de la desviació estàndard.39
- Figura 22.** Percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG segons si les espiguetes estaven inoculades amb *U. syntherismae* o no, respecte a elles mateixes i línies verticals que corresponen a la desviació estàndard.40
- Figura 23.** Representació del percentatge de plàntules infectades i plàntules no infectades obtingut a partir de les dades de l'assaig B.42

Índex de taules

Taula 1. Taula de tipus d'espiguetes, inoculades amb fong o sense inoculació i patró de germinació.	19
Taula 2. Factors aplicats a l'assaig.	23
Taula 3. Taula de tipus d'espiguetes, inoculades amb fong o sense inoculació i profunditat d'enterrament.	24
Taula 4. Factors aplicats a l'assaig.	29
Taula 5. Número de plàntules processades durant l'assaig A, segons la mida de les espiguetes i el tipus de germinació. Número de plàntules infectades i percentatge de plàntules infectades.	32
Taula 6. Anàlisi de la variància dels factors tipus de germinació, mida de les espiguetes i la interacció entre aquests dos factors. La transformació aplicada va ser arcsinus de la proporció de plàntules infectades, en tant per u.	34
Taula 7. Mitjanes poblacionals d'infecció de plàntules de <i>D. sanguinalis</i> tenint en compte la mida de la llavor.	28
Taula 8. Anàlisi de la variància dels factors safata, mida de les espiguetes, profunditat i la interacció entre la mida de les espiguetes i la profunditat. La transformació aplicada va ser arcsinus de la proporció de plàntules infectades en tant per u.	41

1. Introducció

1.1. Antecedents

La forcadella és una mala herba molt comuna arreu del món en camps de conreu i marges. La seva fàcil proliferació fa que sigui necessari controlar-la per tal d'impedir la invasió dels camps de conreu dificultant el bon creixement dels sembrats i la seva recollida.

En aquest sentit, i a partir de la identificació al setembre del 2004 (Mas *et al.*, 2006), a la finca Torre Marimon (Caldes de Montbui, Barcelona, 46° 12' N, 4° 33' E), d'un grup de plantes de forcadella (*Digitaria sanguinalis*) infectades pel fong fitopatogen *Ustilago syntherismae*, que provocava que les espiguetes de les inflorescències de la planta estiguessin totalment substituïdes per una massa d'espores negres -el carbó-, s'han realitzat diversos estudis amb la finalitat de comprendre la interacció entre *Digitaria sanguinalis* i *Ustilago syntherismae*.

1.2. *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

1.2.1. Posició taxonòmica, noms comuns i nomenclatura

Digitaria sanguinalis (L.) Scop. pertany a l'ordre dels Poals, família de les Poàcies (gramínies), subfamília de les Panicòidies i gènere *Digitaria*.

Nom comú català: forcadella, xereix, pota de gall.

Nom comú castellà: pata de gallo, basto blanco, pasto de cuaresma, pasto Milán, garranchuelo, pata de gallina, digitaria peluda.

Nom comú anglès: large crabgrass, hairy crabgrass.

Altres nomenclatures sinònimes: *Dactylon sanguinale* Vill., *Digitaria fimbriata* Link., *Digitaria marginata* Link., *Digitaria Velutina* (Forks.)P. Beayv., *Panicum adscendens* H.B.K., *Panicum sanguinale* L., *Syntherisma sanguinalis* Dulac.

1.2.2. Característiques morfològiques

La forcadella és una planta herbàcia de cicle anual que forma mates que poden ser superiors als 60 cm d'alçada amb inflorescències ascendents, tot i que de vegades en lloc de créixer de forma vertical ho fa aplanada al terra.

La seva tija és de tall llis i glabra, amb nusos pelosos i ramificada (colzada) a la base (Behrendt *et al.*, 1979). Les fulles i baines són amplament linears, amb pilositat generalitzada i constituïda per pèls suaus (0,5 mm) i llargs. La primera fulla és ampla i curta 6 – 7 x 3 mm, en canvi les següents són més allargades (segona fulla 18 x 4 mm) (Recasens *et al.*, 2009). El limbe és de color vermell – violeta i està cobert per pèls sedosos i brillants (Behrendt *et al.*, 1979). La inflorescència està formada per entre 3 – 15 raïms unilaterals, sovint violacis (Bolòs, 2005). La llavor consisteix en tota l'espigueta, que consta de la cariòpside tancada, amb dues flors, una de les quals és estèril (glumel·la) (Jauzein & Montegut, 1983).

1.2.3. Cicle de vida i hàbitat

La forcadella és una planta de cicle anual que pot iniciar la seva germinació al final de la primavera i l'estiu. És una gramínia perjudicial, especialment per al blat de moro, cultius de birbada i hortalisses, així com per als fruiters i vinyes. Es pot trobar en sòls argilosos (humits) de zones càlides i en cultius tropicals i subtropicals (Behrendt *et al.*, 1979) i també en zones temperades amb sòls sorrencs sempre que hi hagi precipitacions suficients durant l'estiu, atès que és una planta altament polimòrfica (Jauzein & Montegut, 1983).

1.2.4. Patró de germinació

Les llavors de *D. sanguinalis* segueixen dos patrons de germinació diferents, depenent de l'òrgan que apareix primer (Verdú & Mas, 2014) (Figura 1):

- Radicular (Ra): el primer que apareix és una radícula emergent a la base de l'espigueta, just on s'uneixen les glumel·les. És el tipus de germinació més típic. Després d'un cert grau de desenvolupament de la radícula, comença a aparèixer el coleòptil.
- Coleoptilar (Co): el primer òrgan que emergeix és el coleòptil. A continuació, s'elonga la zona del coleòptil – mesocòtil, la radícula es comença a desenvolupar i finalment apareix el sistema radicular.

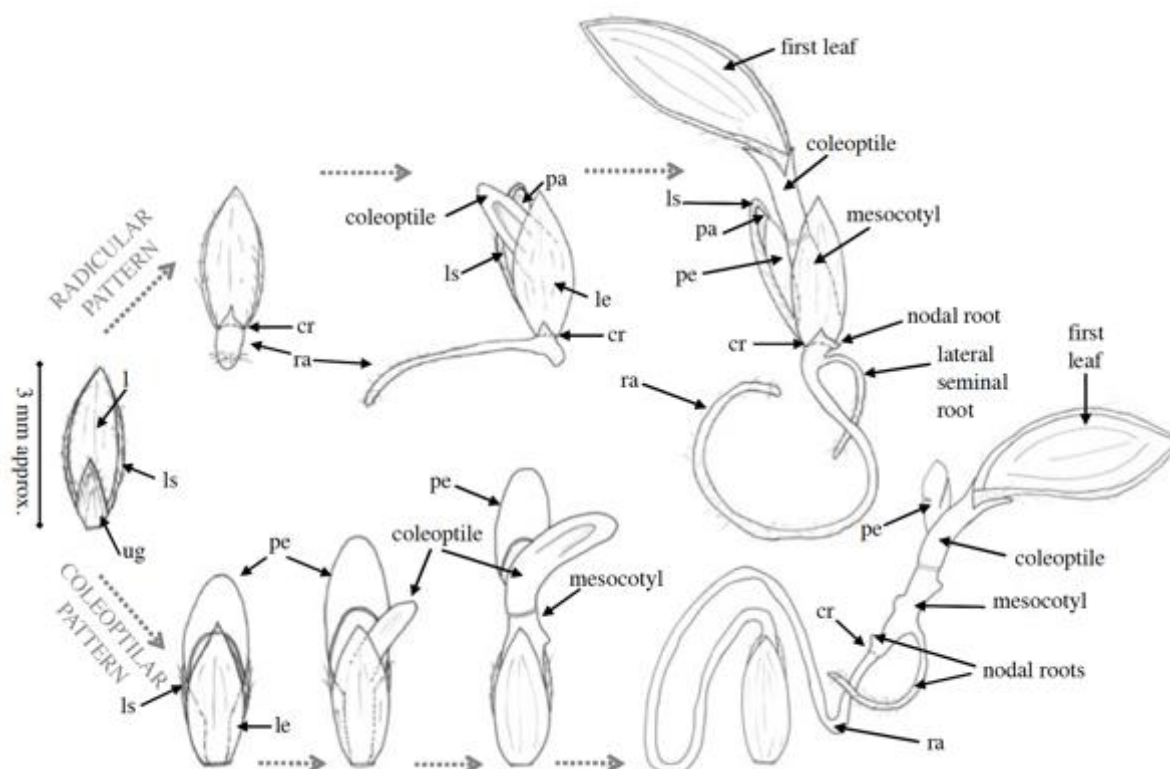


Figura 1. Desenvolupament d'una plàntula de *Digitaria sanguinalis* segons el patró de germinació (Verdú & Mas, 2014).

1.2.5. Profunditat i emergència de *Digitaria sanguinalis*

En un estudi realitzat per Benvenuti *et al.*, (2001), es va observar que el comportament de les llavors en la germinació variava segons la profunditat d'enterrament d'aquestes. En aquest estudi, es va detallar el següent: de 0 a 2 cm el percentatge de germinació era del 60%, a 4 cm del 35%, a 6 cm del 8% i a més de 12 cm no germinaven, fet que es va atribuir a la latència secundària en el 85% de les espiguetes induïda per la profunditat. Johnson & Baudoin (1997) van trobar un comportament similar en *Digitaria ciliaris* on els percentatges de germinació segons la profunditat eren: del 43% a 0,5 cm, del 45% a 1 cm, del 34% a 2 cm i del 14% a 3cm.

Hi ha un altre factor important que pot influir en l'emergència de la *D. sanguinalis*: la mida de l'espigueta. Tal com s'ha vist en varis estudis realitzats en altres plantes com són el bròquil (*Brassica oleracea* ssp. *italica*) (Heather & Sieczka, 1991) i la prunel·la vulgar (*Prunella vulgaris*) (Winn, 1985), com més gran és la llavor més alta és la probabilitat que emergeixi la planta.

1.3. *Ustilago syntherismae*

1.3.1. Posició taxonòmica, noms comuns i nomenclatura

Ustilago syntherismae, és un fong basidiomicet que pertany a l'ordre dels *Ustilaginales*, família de les *Ustilaginaceae* i gènere *Ustilago*.

1.3.2. Característiques morfològiques

Els fongs que formen part de la classe dels ustilaginomicets són predominantment paràsits de plantes, tenen una paret amb una composició característica de carbohidrats amb un domini de glucosa i absència de xilosa. Dins d'aquests, la família dels ustilaginals es caracteritza per septes sense porus. La major part d'espècies d'aquest grup esporulen en les parts reproductores dels seus amfitrions i posseeixen el tipus de teliosporogènesi desarticulador. Majoritàriament formen el fragmobasidi i les teliòspores fosques. Depenent de l'espècie i de vegades també de les condicions ambientals, el fragmobasidi varia en la morfologia (Bauer *et al.*, 2001).

En relació a *Ustilago syntherismae* cal destacar que les teliòspores o ustilòspores, tenen una morfologia globular o subglobular fins a ovoide, amb un diàmetre mitjà de 10 · 12,5 µm. Tenen una paret gruixuda de 0,5 µm, de color marró i rugosa (Mas *et al.*, 2006).

1.4. Interacció *Digitaria sanguinalis* – *Ustilago syntherismae*

1.4.1. Infecció

Els fongs del gènere *Ustilago* són patògens vegetals importants distribuïts per tot el món, que infecten espècies tant monocotiledònies com dicotiledònies. *Ustilago syntherismae*, concretament, causa infeccions sistemàtiques a diverses espècies de *Digitaria*, incloent-hi la forcadella (*Digitaria sanguinalis*) (Vánky, 1994).

Segons un estudi realitzat per Mas & Verdú (2014) la infecció es produeix en les primeres fases de creixement de la planta, específicament en estadi de plàntula. Per tant, *Ustilago syntherismae* no es troba dins la llavor ni tampoc infecta en la fase embrionària de la *Digitaria*.

Hi ha diferents factors que incideixen en la infecció de la planta: la posició del fong respecte les espiguetes, la germinació simultània de les espores d'*U. syntherismae* i de les espiguetes de *D.*

sanguinalis, la capacitat d'infecció de l'espore i la susceptibilitat de la forcadella, la profunditat d'enterrament de l'espigueta -a més profunditat més possibilitat d'infecció- i la cohort¹ en què germina la plàntula. A més, es baralla la hipòtesi que el tipus de germinació també té incidència en la infecció -en el cas de germinació tipus radicular es dona un període de temps en què les bràctees de l'espigueta es mantenen una mica separades degut al creixement de l'embrió, aquest període coincideix amb l'elongació de la radícula, durant aquesta fase, -que en la germinació coleoptilar no existeix-, es podria donar la infecció; quant a les plantes amb germinació tipus coleoptilar, podrien ser capaces de generar més mecanismes de resistència (Verdú & Mas, 2014).

En l'estudi mencionat anteriorment, Verdú & Mas (2014) van observar que la densitat màxima de miceli d'una plàntula infectada es trobava pròxima al meristema apical de la tija, a la base del coleòptil. Els estomes del coleòptil són obertures naturals que faciliten la penetració de l'hifa infectiva. No obstant, en algunes plàntules infectades, el miceli només es podia observar al mesocòtil, aquest fet indica que aquesta també pot ser una zona de fàcil accés per al fong.

La intensitat d'infecció de la planta està també amb relació a un aspecte temporal, és a dir, el període de temps que transcorre entre la germinació i l'emergència de la plàntula. Cal esmentar que tant la forcadella com el carbó tenen una sola generació a l'any i arriben a la fase reproductiva alhora (Verdú & Mas, 2015).

1.4.2. Grau d'afectació del fong a la planta

Ustilago syntherismae té una incidència negativa en la reproducció de *Digitaria sanguinalis* ja que causa una important disminució en la producció de llavors (Gallart *et al.*, 2009). En la planta infectada les inflorescències són substituïdes per una massa d'espores de carbó negres-marronoses de 3-5 cm de llargada de textura polsosa. Al principi, aquesta massa no és visible ja que es troba amagada darrere la fulla bandera que la recobreix (Vánky, 1994).

Segons el nivell d'afectació de la planta, es determinen tres graus d'infecció:

- Plantes aparentment sanes (PAS); en aquestes plantes no s'observa carbó en les inflorescències. Tot i haver estat en contacte amb el fong, la planta no desenvolupa la malaltia.

¹ Cohort: Grup d'individus d'una població que emergeixen en un mateix moment.

- Plantes parcialment encarbonades (PPE); en aquestes plantes s'hi troben tant llavors aparentment viables com espores de carbó.
- Plantes totalment encarbonades (PTE); la totalitat de la inflorescència està coberta per espores de carbó, no s'observen llavors.

En l'estudi realitzat per Gallart *et al.* (2009) es va deduir que la presència del fong pot produir canvis morfològics en la planta, per exemple la reducció de la producció de brots i de l'alçada de la planta i l'increment de la quantitat de nodes, ramificacions i inflorescències. És en aquest estudi que no es va poder descartar que hi hagués un efecte de la densitat de plantes. D'altra banda es va observar que la presència de fong no incideix en la mortalitat de la planta.

En general, els resultats van mostrar que la malaltia va reduir la producció i l'alçada de la planta i va augmentar la quantitat de nodes, ramificacions i inflorescències.

1.4.3. Distribució del fong dins la planta

La proliferació de la infecció està en funció del fet que la planta elongui els entrenusos en més rapidesa que el fong en colonitzar-los.

En les plantes totalment encarbonades el fong es distribueix per la tija de la planta, essent més fàcilment visible als nusos que als entrenusos. Les seves hifes es troben associades als teixits vasculars i al parènquima. En canvi, en les plantes parcialment encarbonades el miceli s'observa a la part basal de l'hoste i en els nusos de les ramificacions amb inflorescències encarbonades. En algun cas també es pot trobar al primer nus de les ramificacions amb inflorescències sanes. Pel que fa a les plantes asimptomàtiques, el miceli pot aparèixer a la base de la tija, encara que no s'apreciï cap signe extern d'infecció (Mas & Verdú 2014).

1.4.4. Control biològic de la mala herba

Actualment, el control de la forcadella en els cultius acostuma a fer-se mitjançant herbicides. El seu ús freqüent durant les últimes dècades ha comportat que la planta hagi desenvolupat resistències als efectes dels herbicides emprats (Wiederholt & Stoltenberg, 1993). El desenvolupament de resistència a herbicides i la conscienciació que cal evitar l'aplicació de productes tòxics com són els herbicides en els conreus destinats a l'alimentació, així com l'acumulació de residus tòxics en el medi ambient han intensificat la recerca de mètodes de control biològic per la *D. sanguinalis*. Els agents de control

biològic especialment els fongs patògens de les plantes, s'han mostrat efectius en el control de males herbes problemàtiques específiques (Zhu & Qiang, 2004).

A dia d'avui, es poden trobar estudis de tres agents de control biològic:

- *Curvularia intermedia*. Aquest fong produeix des d'una lleugera necrosi en els cotilèdons i les fulles fins a extenses lesions necròtiques que s'estenen a totes les fulles i tiges de la planta provocant la seva mort. Visualment, les lesions són de color gris, allargades i envoltades de teixit cloròtic (Tilley & Walker, 2002).
- *Curvularia eragrostidis*. Les lesions que s'aprecien en aquest cas es troben a les fulles i són de color marró vermellós, en forma d'anell i envoltades de teixit cloròtic, s'expandeixen ràpidament al voltant de la fulla fins que la planta mor (Zhu & Qiang, 2004).
- *Ustilago syntherismae*. A nivell macroscòpic l'únic símptoma de la malaltia que es pot apreciar és l'aparició d'inflorescències transformades amb sorus amb carbó, d'aquesta manera impedeix la reproducció de la planta.

2. Objectius

La rellevància d'aquest treball rau en el fet que *D. sanguinalis* és una mala herba present en varis tipus de conreus amb una incidència econòmica considerable a tot el món. En estudis previs sobre *D. sanguinalis* s'ha posat èmfasi en l'estudi del patosistema *Digitaria sanguinalis* – *Ustilago syntherismae* amb l'objectiu de reduir-ne les grandàries de població. També és l'objectiu d'aquest treball obtenir coneixements pel control de la forcadella.

Definició dels objectius:

- Analitzar el grau d'infecció de *D. sanguinalis* amb espores de *U. syntherismae* en funció de la profunditat d'enterrament de les espiguetes.
- Analitzar el grau d'infecció de *D. sanguinalis* amb espores de *U. syntherismae* en funció de la cohort en què la plàntula emergeix.
- Analitzar el grau d'infecció de *D. sanguinalis* amb espores de *U. syntherismae* en funció de la mida de les espiguetes.
- Comprovar la relació existent entre el patró de germinació i la infecció de *D. sanguinalis* per *U. syntherismae*.

3. Materials i mètodes

3.1. Material biològic

3.1.1. Material vegetal

Per realitzar l'estudi, es van utilitzar espiguetes de *D. sanguinalis* provinents de Torre Marimon (Caldes de Montbui, Barcelona), d'una parcel·la destinada a l'anàlisi del patosistema *Digitaria sanguinalis* – *Ustilago syntherismae*, recollides el 20 de novembre del 2015.

Les espiguetes es van separar mitjançant un sedàs i amb observació mitjançant lupa binocular en grans (espiguetes més grans o iguals a 3 mm) o petites (espiguetes més petites de 3 mm).

3.1.2. Material fúngic

Per realitzar la infecció es van utilitzar teliòspores de *U. syntherismae* extretes de plantes amb totes les inflorescències transformades amb sorus amb carbó, recollides els dies 15 d'octubre, 3 de novembre i 20 de novembre de 2015 a la mateixa parcel·la de Torre Marimon.

3.1.3. Terra

La terra utilitzada va ser substrat comercial COMPO SANA® Semilleros barrejat amb terra argilosa recollida a la mateixa parcel·la de Torre Marimon, la proporció aproximada era de 50% substrat – 50% terra, un cop realitzada la barreja, es va autoclavar per assegurar que els únics elements biològics influents en l'experiment fossin *D. sanguinalis* i *U. syntherismae*.

3.2. Assaig A

Per comprovar que el material biològic utilitzat en aquest experiment era viable, és a dir, per veure si la forcadella germinava i el carbó la infectava i també per descartar que la *D. sanguinalis* tingués cap tipus de mecanisme de resistència que impedís la infecció, es va realitzar un estudi en plaques de Petri a més de l'estudi que avaluava l'efecte de la profunditat d'enterrament de les espiguetes en l'emergència i la infecció d'aquestes pel carbó. Es va procedir a realitzar la infecció mitjançant un mètode d'inoculació al buit per induir artificialment la interacció entre la planta i el fong (Hurtado *et al.*, 2009).

Les fonts de variació considerades en aquest cas van ser:

- Mida de les espiguetes: grans (espiguetes ≥ 3 mm) o petites (espiguetes < 3 mm).
- Patró de germinació: radicular (Ra) o coleoptilar (Co).

I la variable resposta la proporció de plàntules infectades.

3.2.1. Preparació material vegetal

Es van pesar 0,695 g d'espiguetes de *Digitaria sanguinalis* TM2015 i es van partir en dos grups, per tenir així espiguetes amb fong i espiguetes sense fong (blanc), un cop separades, es va procedir a la desinfecció superficial d'aquestes amb una solució d'hipoclorit de sodi (NaOCl) al 5% agitant de manera manual i també amb una agitadora durant 10 minuts, a continuació es van rentar amb dos litres d'aigua destil·lada mitjançant un embut de filtre ceràmic i un matràs Kitasatos.

3.2.2. Inoculació al buit

Per realitzar la infiltració es va preparar en un tub de Pyrex amb tap de rosca una dissolució d'espores amb solució nutritiva, concretament solució mineral nutritiva completa per plantes (Arnon & Hoagland, 1940) estèril amb 1 mL de tween al 0,001% per cada 200 mL d'aquesta, a raó de 0,05 g d'espores per cada 5 mL de TM2015 (Jorba, 2014). A continuació, es van afegir les espiguetes desinfectades prèviament dins la solució d'espores i es va agitar enèrgicament durant 10 minuts. Un cop acabat aquest procés es va posar el tub amb les espiguetes i la solució al dessecador amb un tap de cotó i es va infiltrar al buit, tres vegades, durant deu minuts cadascuna, deixant un descans de 2 minuts entre aquestes, el buit aplicat va ser de -800 mbar (Hurtado *et al.*, 2009). Seguidament, es va decantar el tub per llençar el sobrenedant, recollint-lo en un altre tub que es va traslladar a la cambra per mirar si les espores germinaven, i un cop extret, es va invertir el tub damunt del paper de filtre de manera que aquest xuclés el líquid. Tot seguit es van traslladar les espiguetes entre papers de filtre per eixugar-les bé. Finalment es van deixar per que s'acabessin d'eixugar a l'aire.

Tot aquest procés es va realitzar també en el grup de blanc amb solució nutritiva sense espores per tal que totes les espiguetes es trobessin en les mateixes condicions.

3.2.3. Preparació material fúngic

Es van preparar tres solucions d'espores, cadascuna d'aquestes amb una tercera part de les espores disponibles (aproximadament 0,1 g d'espores) en 10 mL de solució nutritiva mineral nutritiva completa per plantes (Arnon & Hoagland, 1940) estèril per evitar contaminacions amb Tween al 0,001%, durant tres dies consecutius i es van utilitzar després per afavorir la infecció. A continuació, es van col·locar a la cambra de germinació a 20 °C – 12 h de fosc i 30 °C 12 h de llum.

3.2.4. Disseny experimental

Es van separar els quatre tipus d'espiguetes, gran – blanc (GB), petita – blanc (PB), gran – fong (GF) i petita – fong (PF), en cinc plaques de Petri diferents amb paper de filtre humitejat amb 4 mL de solució nutritiva (hi havia dues plaques del tipus PF) i es van deixar durant 24 hores en un règim de semiobscuritat a temperatura ambient. Passades les 24 hores, es van posar les plaques a la cambra de germinació amb el mateix règim de llum – fosc que les solucions d'espores.

Durant els següents onze dies es va anar fent un seguiment de la germinació de les espiguetes de cadascuna de les cinc plaques anotant les espiguetes germinades en cada cas i si era necessari, es tornava a humitejar la placa amb solució nutritiva.

Al cap de tres dies, van començar a aparèixer espiguetes que ja havien germinat, aquestes es van passar a unes altres plaques de Petri amb paper de filtre groc gruixut de la marca Albet (Albet DP 3645 090) humitejat amb 4 mL de les solucions d'espores en el cas de les espiguetes infiltrades amb fong i de solució nutritiva en el cas del blanc. A cada placa s'hi van posar aproximadament unes 20 plàntules i es van separar segons el patró de germinació (veure Taula 1). A continuació, les noves plaques es van segellar amb Parafilm i es van tapar amb paper d'alumini, per simular l'enterrament en el sòl i aconseguir així l'allargament del mesocòtil, i es van introduir a la cambra de germinació.

Taula 1. Taula de tipus d'espiguetes, inoculades amb fong o sense inoculació i patró de germinació.

Espiguetes grans				Espiguetes petites			
Blanc		Fong		Blanc		Fong	
Ra	Co	Ra	Co	Ra	Co	Ra	Co

Passades 48 hores les plaques tapades amb paper d'alumini es van destapar i es van deixar un mínim de deu dies més a la cambra de germinació (veure Figura 2), en aquest cas en el mateix règim de llum

que les solucions d'espores, ja que aquest era el temps mínim per poder començar a processar les plàntules que haguessin sobreviscut.

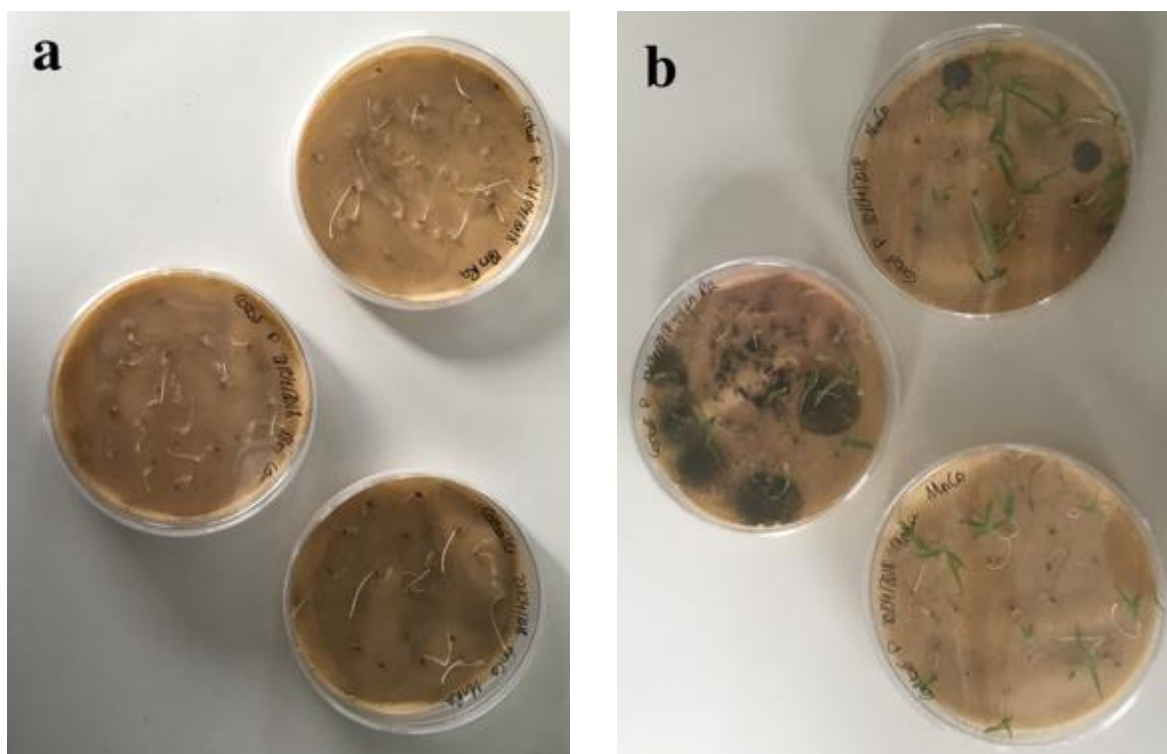


Figura 2. a: plàntules de l'assaig A de *D. sanguinalis* inoculades amb *U. syntherismae* després de ser destapades (es pot observar l'elongació del mesocòtil). b: plàntules després d'haver passat deu dies a la cambra de germinació. (Autora: Rosa Reverter).

3.2.5. Tinció

Utilitzant unes pinces i sota la lupa binocular (9x-40x), es va estirar amb compte la primera fulla i la radícula per obtenir d'aquesta manera el mesocòtil i el coleòptil. Per transparentar-les es van passar a un cossi amb KOH al 10%, es van tancar amb un vidre i a continuació es van posar sobre una placa calefactora durant tres hores a aproximadament 40 °C (veure Figura 3 i 4). Un cop transcorregut el temps, es van passar les estructures a un altre cossi amb aigua destil·lada per rentar-les i seguidament, es van passar a un altre cossi amb blau de toluidina durant 15 minuts per tenyir-les (veure Figura 4). Finalment, passats els 15 minuts, es van tornar a passar a un altre cossi amb aigua destil·lada i a continuació es va procedir al muntatge de les mostres (Mas & Verdú, 2014).

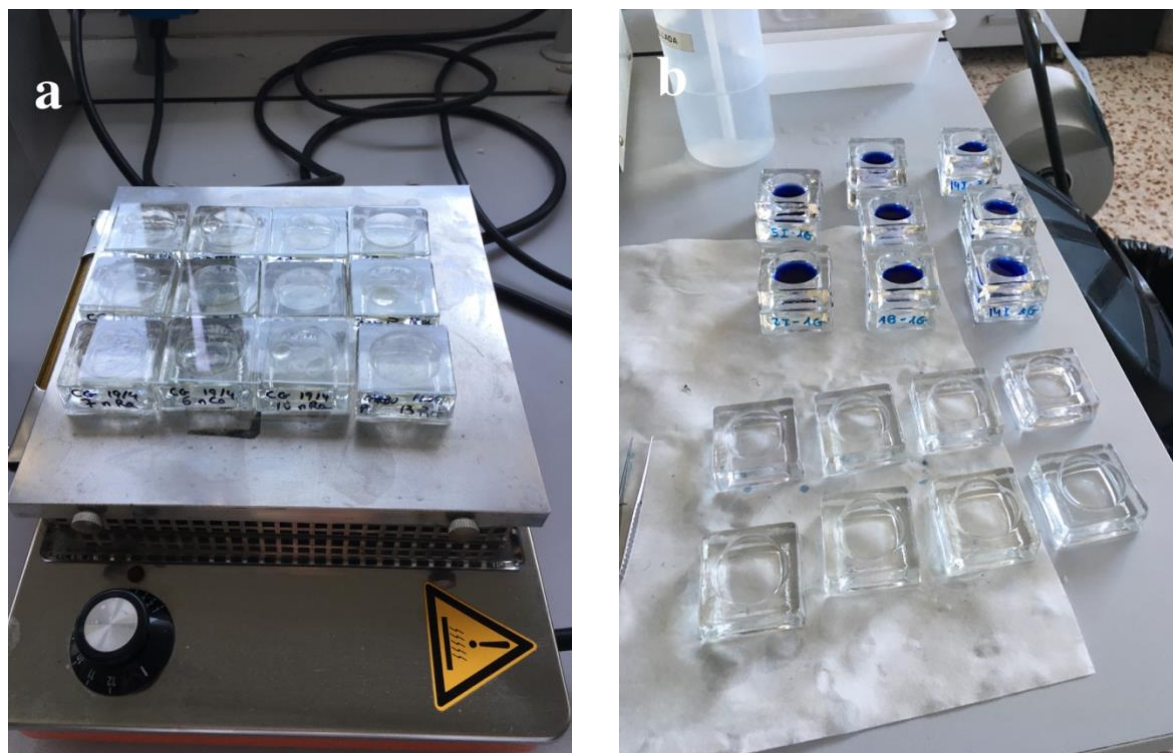


Figura 3. a: cossis amb plàntules de *D. sanguinalis* preparades per l'observació i amb NaOH al 5% tapades amb un vidre i situades sobre la placa calefactors. b: cossis amb aigua destil·lada i cossis amb blau de toluídina contenint plàntules de *D. sanguinalis*. (Autora: Rosa Reverter).



Figura 4. Cossis amb aigua destil·lada que contenen les plàntules de *D. sanguinalis* i cossis amb blau de toluídina a sota. (Autora: Rosa Reverter).

En el cas que hi hagués alguna mostra que no es pogués tenyir i observar el mateix dia en el que es va realitzar, aquesta es posava en un altre cossi amb aigua destil·lada i a dins la nevera a entre 4 – 8 °C i a les fosques.

Per realitzar el muntatge, es van preparar portaobjectes amb una gota de medi de muntatge, en aquest cas, alcohol polivinil diluït, i a continuació es van disposar les plàntules tenyides i transparentades sobre aquests, de manera que en cada portaobjectes s'hi posava un màxim de 5 plàntules disposades en el mateix sentit i orientació per facilitar la posterior observació (veure Figura 5). Un cop situades les plàntules sobre el portaobjectes es van situar un cobreobjectes a sobre i es va realitzar un squash (aplicant una mica de pressió a sobre) per tal d'aixafar els teixits. Els portaobjectes es van retolar per identificar-los.

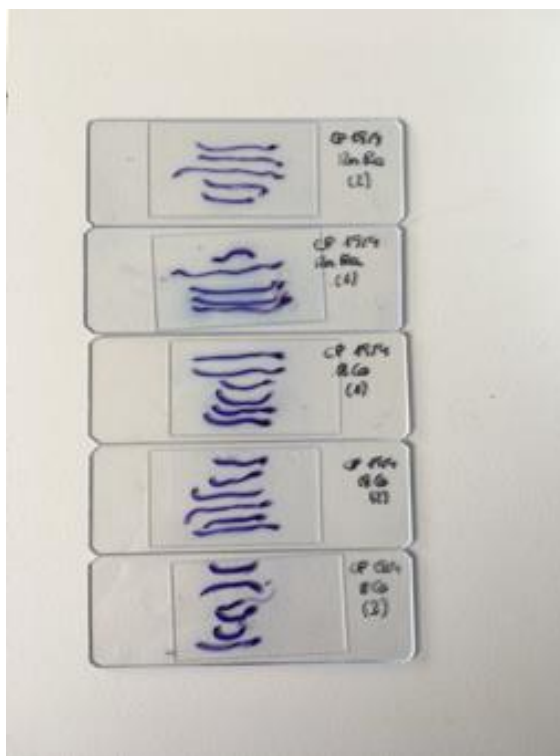


Figura 5. Preparacions de *D. sanguinalis*. (Autora: Rosa Reverter).

Si alguna de les preparacions no es podia observar el mateix dia que s'havia realitzat, per guardar-les, es lacaven amb laca d'ungles, ja que aquesta afavoria el manteniment del medi durant més temps i així s'aconseguia que la preparació durés dos o tres dies sense fer-se malbé.

3.2.6. Observació

Un cop realitzades les preparacions, es va procedir a l'observació d'aquestes en el microscopi òptic de fins a 400 augments.

Per determinar si una plàntula estava infectada o no, es realitzava l'observació d'aquesta des del coleòptil fins l'arrel. En els casos en què s'observava alguna hifa, es considerava que aquesta plàntula

estava infectada i ja no calia observar-la més, no obstant, si no es trobava cap hifa, s'havia de revisar la plàntula en la seva totalitat fins estar segurs que no hi havia cap estructura del fong.

3.2.7. Tractament de dades de l'assaig A

3.2.7.1. Estudi de la germinació

Durant el temps en què es va realitzar aquest assaig es van anar recollint les dades de germinació. Un cop finalitzat, es van analitzar mitjançant estadística descriptiva, on es van calcular els percentatges de germinació acumulada globals i separant les dades segons les fonts de variació considerades en l'assaig (mida de les espiguetes i patró de germinació).

3.2.7.2. Estudi de la infecció

Per poder estudiar la infecció d'*U. syntherismae*, tenint en compte les mateixes fonts de variació, també es va fer la recollida de dades prèvia a l'anàlisi. En aquesta, es va decidir denominar les plàntules que tenien hifes d'*U. syntherismae* amb 1 i les que no en tenien amb 0. D'aquesta manera, les dades obtingudes eren binomials. Es van considerar 28 plaques que contenien cadascuna d'elles aproximadament unes 20 plàntules, amb un total de 240 plàntules observades.

Per realitzar l'anàlisi de la variància amb dos factors (veure Taula 2), va ser necessari aplicar una transformació prèvia de les dades obtingudes quant a la infecció, fent l'arcsinus en tant per u. En totes les anàlisis, el nivell de significació va ser de 0,05.

Taula 2. Factors aplicats a l'assaig.

Factors	Nivells
Mida de les espiguetes	Grans
	Petites
Patró de germinació	Radicular
	Coleoptilar

3.3. Assaig B

Per poder esbrinar les diferències en l'emergència de la forcadella i en la infecció d'aquesta amb el carbó que la pot infectar (*U. syntherismae*), es va utilitzar el mateix material que en l'assaig anterior, per tant, les espiguetes es van preparar de la mateixa manera i inoculades al buit.

Les fonts de variació considerades per avaluar la infecció i l'emergència, van ser les següents:

- Profunditat a la qual s'enterren les espiguetes: 1 cm o 3 cm.
- Mida de les espiguetes: grans (espiguetes ≥ 3 mm) o petites (espiguetes < 3 mm).
- Cohort.

3.3.1. Disseny experimental

En aquest assaig, de la mateixa manera que en l'assaig anterior, es van utilitzar les espiguetes separades en GB, PB, GF i PF, però amb una altra variació, la profunditat d'enterrament de les espiguetes que podia ser de 3 cm o d'1 cm. Per tant, en cada test s'hi podien trobar espiguetes grans a 3 cm (3G), espiguetes petites a 3 cm (3P), espiguetes grans a 1 cm (1G) i espiguetes petites a 1 cm (1P), separant els testos d'espiguetes sense fong i espiguetes amb fong (veure Taula 3).

Taula 3. Taula de tipus d'espiguetes, inoculades amb fong o sense inoculació i profunditat d'enterrament.

Espiguetes grans				Espiguetes petites			
Blanc		Fong		Blanc		Fong	
1 cm	3 cm	1 cm	3 cm	1 cm	3 cm	1 cm	3 cm

Els testos utilitzats en aquest experiment eren de 6 cm x 6 cm d'ample i de 10 cm d'alt, aquests es van omplir en primer lloc amb un centímetre d'escorça per impedir que, al regar, la terra se n'anés amb l'aigua. A continuació, també amb la mateixa finalitat, es va posar un tros de manta tèrmica de 24,5 cm x 24,5 cm i seguidament es va afegir la terra, prèviament preparada, i els separadors, consistents amb una reixa de plàstic situada amb forma de creu que permetia el pas de l'aigua entre els diferents espais (veure Figura 6), per poder posar els quatre tipus d'espiguetes d'aquest assaig (3G, 3P, 1G i 1P).

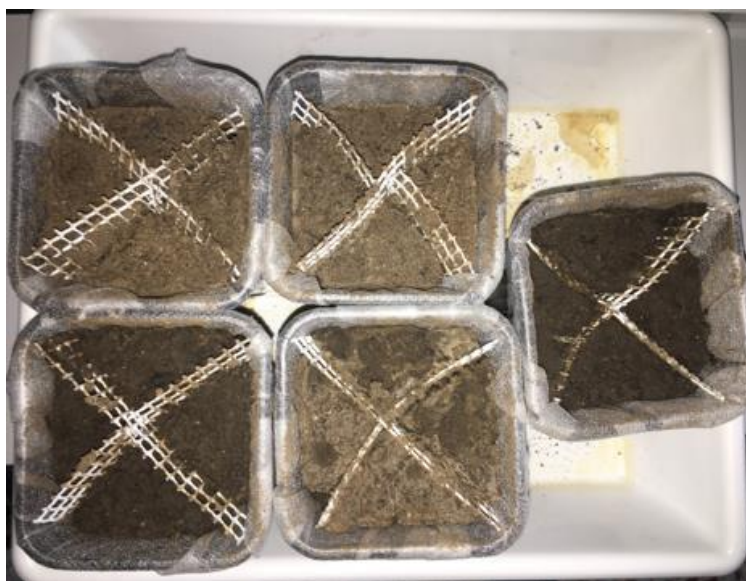


Figura 6. Disposició de les espiguetes en els testos en l'assaig B. Es poden apreciar les separacions que delimitaven les zones on es trobaven les espiguetes amb les diferents mides i les diferents profunditats on s'havien enterrat. (Autora: Rosa Reverter).

Per poder posar les espiguetes en els testos, es va afegir una capa de terra més o menys uniforme que simulava la primera profunditat de les espiguetes, és a dir, la profunditat de 3 cm, en aquesta capa, es van afegir tres espiguetes de cada mida, grans i petites i seguidament es van afegir a sobre els 3 cm de terra, a més, en els dos apartats del test que havien quedat buits, s'hi va afegir una altra capa de 2 cm, on es van col·locar les altres espiguetes; també 3 espiguetes de les dos mides. Finalment s'hi va posar a sobre 1 cm més de terra, aconseguint així les diferents profunditats d'enterrament i una capa uniforme a sobre.

En total, es van preparar 20 testos -quatre dels quals eren blanc-, i es van disposar en quatre safates (veure Figura 7), de manera que en cadascuna d'aquestes hi haguessin quatre testos d'espiguetes inoculades i un de espiguetes sense fong, cadascuna d'aquestes representava una rèplica. En els testos, mitjançant el disseny split – plot es van situar els diferents tipus d'espiguetes i profunditats, per tal de recollir la variabilitat ambiental. Les quatre safates es van situar en els dos pisos inferiors de la cambra de germinació de manera que en cada pis hi haguessin dues safates.



Figura 7. Disposició de les safates que contenen els testos amb les espiguetes de *D. sanguinalis* en la cambra de germinació en l'assaig B. (Autora: Rosa Reverter).

3.3.2. Reg

Es va realitzar un reg a la setmana durant les tretze setmanes que va durar l'assaig, a excepció de l'última setmana de març que no es va realitzar el reg, per tant, es van realitzar un total 12 regs.

El reg es va realitzar inicialment afegint 35 mL d'aigua a cadascun dels testos (ja que era el volum mínim a partir del qual l'aigua començava a regalimar), i a continuació s'afegien 500 mL més a la safata, aconseguint així simular una pluja de 10 mm per metre quadrat.

En el reg de la sisena setmana, tenint en compte que s'estaria més temps sense reg, perquè els testos no es quedessin secs es va decidir repartir tota l'aigua per sobre d'aquests, de manera que es van afegir aproximadament 150 mL per test i 50 mL més a la safata. Durant les següents setmanes i fins al final de l'experiment, el reg es va realitzar afegint 140 mL per test, obtenint així de la mateixa manera que en els primers 5 regs, una pluja de 10 mm per metre quadrat.

Durant les tretze setmanes en què es va realitzar l'experiment es va anar fent un seguiment de les plàntules que anaven germinant anotant-les, identificant-les i realitzant la posterior tinció i observació al microscopi.

3.3.3. Tinció

En aquest assaig, la tinció de les plàntules que germinaven era gairebé igual que l'explicat a l'apartat 1.2.5., l'única variació en aquest cas era la preparació de les plàntules, ja que el mesocòtil no estava descobert (veure Figura 8 i 9) i el que s'havia de fer en primer lloc, era retirar les fulles amb pinces i sota la lupa binocular fins a aconseguir la tija el més neta possible per poder procedir amb l'observació. El més important en aquest cas era agafar la secció on hi havia el coleòptil. La resta de la tinció es va fer de la mateixa manera que s'explica en l'apartat de tinció de l'assaig anterior.



Figura 8. Primera plàntula que va germinar i emergir en l'assaig B (data de germinació 21-02-2018). b: Primera plàntula que va germinar en el moment en què es va realitzar l'observació per veure si tenia fong o no (13-03-2018). (Autora: Rosa Reverter).



Figura 9. a: Plàntula sencera del grup control de *D. sanguinalis* abans de ser processada. b: Preparacions de *D. sanguinalis* ja tenyides preparades per l'observació al microscopi. (Autora: Rosa Reverter).

3.3.4. Observació i recompte de les plàntules no emergides

Durant les setmanes en què es va realitzar l'experiment, només va emergir un 15,03% de les plàntules. És per aquest motiu que es va decidir realitzar una observació més exhaustiva i buscar què és el que havia passat.

Per fer-ho, es va decidir examinar els testos on havien estat enterrades les espiguetes, buscar-les i un cop trobades classificar-les en espiguetes germinades no emergides (LGNE) i espiguetes no germinades (LNG). Les espiguetes on es podia observar algun tipus de radícula, mesocòtil o bé espiguetes obertes o buides es van classificar en LGNE i les espiguetes que es veien senceres en LNG. D'aquesta manera es van poder observar el 99,6% de les espiguetes sembrades (hi va haver una espigueta que no es va poder trobar).

3.3.5. Tractament de dades de l'assaig B

3.3.5.1. Estudi de la germinació

De la mateixa manera que en l'assaig anterior, es va procedir a la recollida de les dades de germinació durant el temps en què es va realitzar l'estudi. Es van denominar amb 1 les espiguetes germinades amb plàntules emergides (LGE), les espiguetes germinades amb plàntules no emergides (LGNE) i les espiguetes no germinades (LNG). Aquestes, es van tractar amb estadística descriptiva en primer lloc, analitzant cada safata com una mostra diferent, i a continuació, també fent una transformació mitjançant l'arcsinus en tant per u, es va realitzar l'anàlisi de la variància amb dos factors (veure Taula 4).

Taula 4. Factors aplicats a l'assaig.

Factors	Nivells
Mida de les espiguetes	Grans
	Petites
Profunditat d'enterrament de les espiguetes	1 cm
	3 cm

3.3.5.2. Estudi de la infecció

Com a conseqüència de l'obtenció de poques dades d'infecció en aquest estudi, l'anàlisi de les dades que es va realitzar va ser mitjançant estadística descriptiva.

4. Resultats i discussió

4.1. Seguiment de la germinació de l'assaig A

Durant els onze dies en què es va realitzar el seguiment de la germinació de les espiguetes de *D. sanguinalis* en les plaques de Petri, es van obtenir les dades per poder realitzar el percentatge de germinació acumulada (veure Figura 10). Tal com s'observa, la germinació es va produir a partir del tercer dia. A l'onzè dia es va considerar que ja es disposava de suficient nombre d'espiguetes per a realitzar l'estudi i per tant es va aturar l'observació de la germinació.

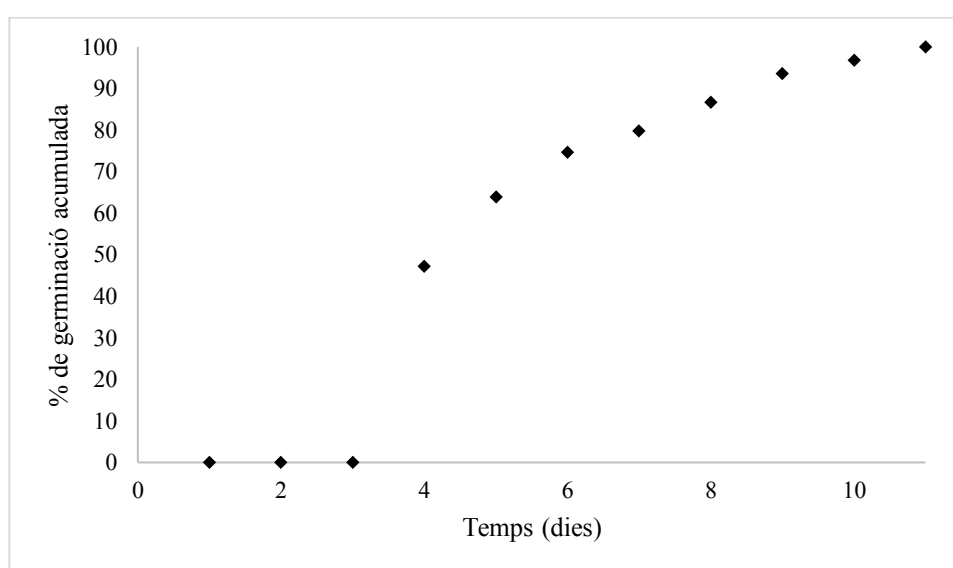


Figura 10. Percentatge de germinació acumulada d'espiguetes de *D. sanguinalis* al llarg del temps.

El següent pas de l'anàlisi fou diferenciar la germinació de les espiguetes segons el patró de germinació; radicular i coleoptilar. El resultat va ser 32,10% coleoptilar i 67,90% radicular (veure Figura 11).

Les dades de germinació que segueixen el patró radicular, són similars a les obtingudes en les plantes recol·lectades al camp entre els anys 2006 i 2009, provinents d'espiguetes aparentment sanes per Mas & Verdú (2014), en què les freqüències mitjanes oscil·laven entre el 54% i el 69%.

D'altra banda i pel que fa a les espiguetes germinades amb un patró coleoptilar, s'observa que el valor obtingut en aquest estudi també es troba en el rang de les freqüències mitjanes trobades per Mas & Verdú (2014) que va des del 31% fins al 46%.

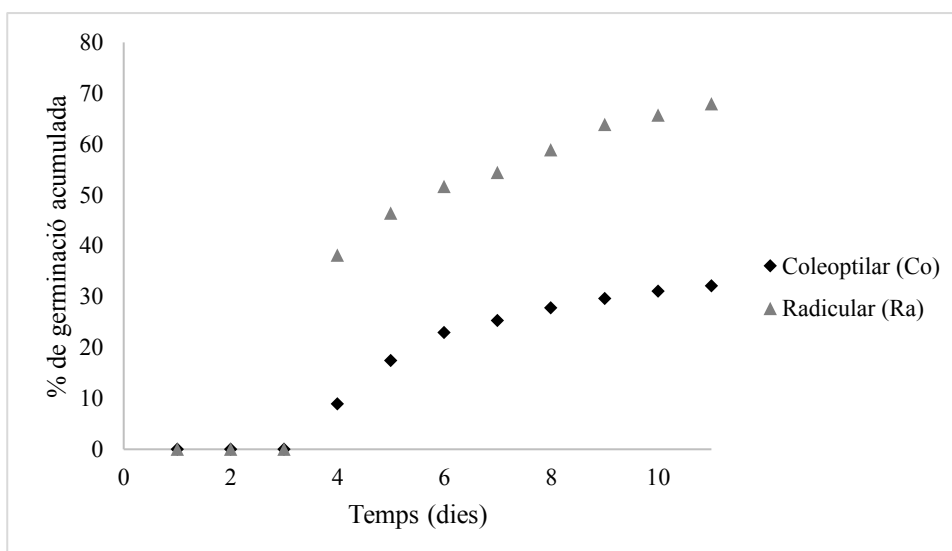


Figura 11. Percentatge de germinació acumulada d'espiguetes de *D. sanguinalis* al llarg del temps segons el patró de germinació (Radicular o coleoptilar).

Pel que fa a l'anàlisi de la germinació segons la mida de les espiguetes, s'aprecia que el percentatge de germinació d'espiguetes petites (66,29%) és més alt que el d'espiguetes grans (33,71%) (veure Figura 12). Aquesta dada està condicionada al fet que el nombre d'espiguetes petites, ja de partida, era superior al d'espiguetes grans (aproximadament les espiguetes de mida petita eren el doble que les de mida gran). D'altra banda, Benvenuti *et al.*, (2001) indicava en el seu estudi que una major grandària de les llavors podia significar una major resistència a situacions ecològiques inadequades, fet que faria esperar que les espiguetes grans tinguessin un percentatge més elevat de germinació que les petites. En aquest cas les condicions de laboratori no suposaven estrès a les plàntules.

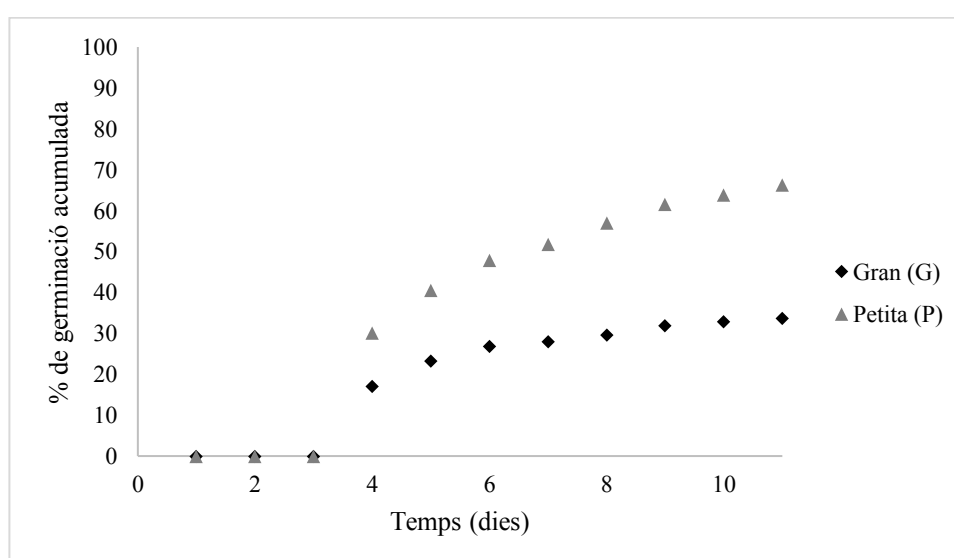


Figura 12. Percentatge de germinació acumulada d'espiguetes de *D. sanguinalis* al llarg del temps segons la mida de la llavor (gran o petita).

A partir d'aquell moment, l'estudi es va centrar en la cerca de la proporció de plàntules de *D. sanguinalis* infectades amb *U. syntherismae*.

4.2. Dades d'infecció de l'assaig A

4.2.1. Resultats obtinguts

En aquest assaig es van processar un total de 28 plaques de Petri, que contenien 465 espiguetes germinades, de les quals 7 plaques eren del grup control (103 espiguetes). En total es van tenir i observar 240 plàntules.

De les plàntules infiltrades, el percentatge d'infecció va ser del 93,60% (veure Taula 5). Cal esmentar que no es van trobar hifes internes en cap de les plàntules del grup control, tot i que en algunes plàntules sí que es van poder observar fongs diferents a *U. syntherismae* (veure Figura 13, 14 i 15).

Taula 5. Número de plàntules processades durant l'assaig A, segons la mida de les espiguetes i el tipus de germinació. Número de plàntules infectades i percentatge de plàntules infectades.

Mida de les espiguetes	Tipus de germinació	Número de plàntules	Número de plàntules infectades	Percentatge de les plàntules infectades (%)
Gran	Ra	44	41	93,18
	Co	15	11	73,33
Petita	Ra	80	78	97,50
	Co	33	31	93,94

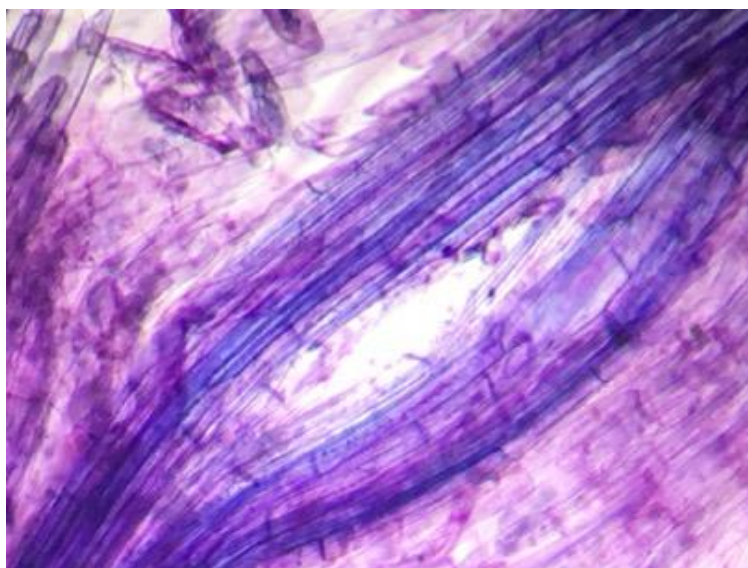


Figura 13. Plàntula de *D. sanguinalis* no infectada. Es poden observar els teixits vasculars del mesocòtil. imatge realitzada a 100 augments. (Autora: Rosa Reverter).

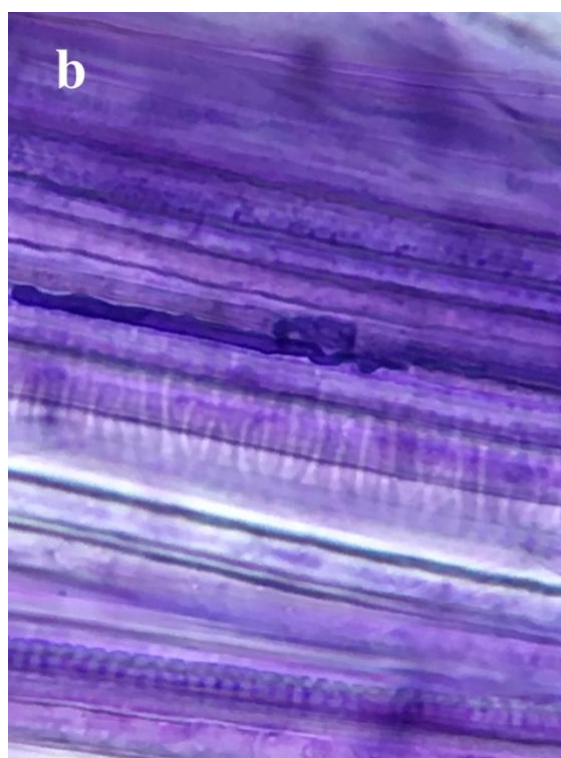
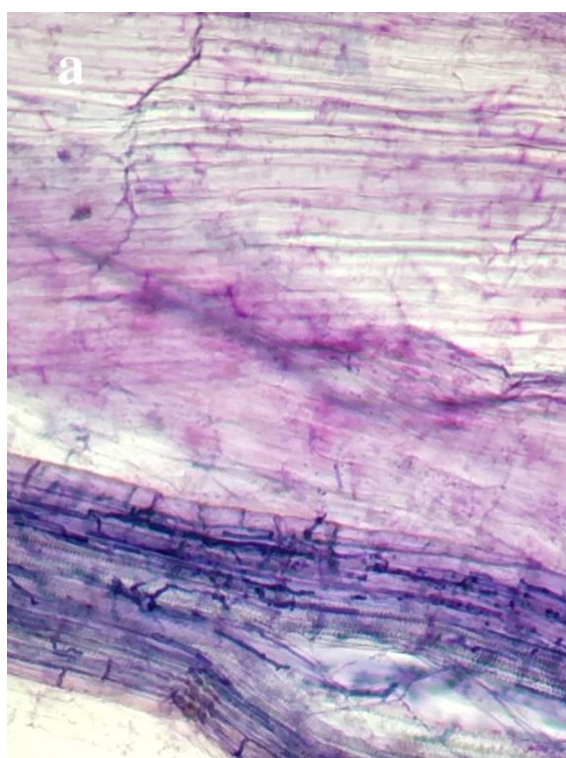


Figura 14. a: plàntula de *D. sanguinalis* infectada amb *U. syntherismae*. S'hi observen les hifes del fong tenyides amb blau fosc. Imatge realitzada a 400 augments. b: plàntula de *D. sanguinalis* infectada amb *U. syntherismae*. Es poden veure les hifes tenyides de color blau fosc associades als teixits vasculars del mesocòtil. Imatge realitzada a 400 augments. (Autora: Rosa Reverter).

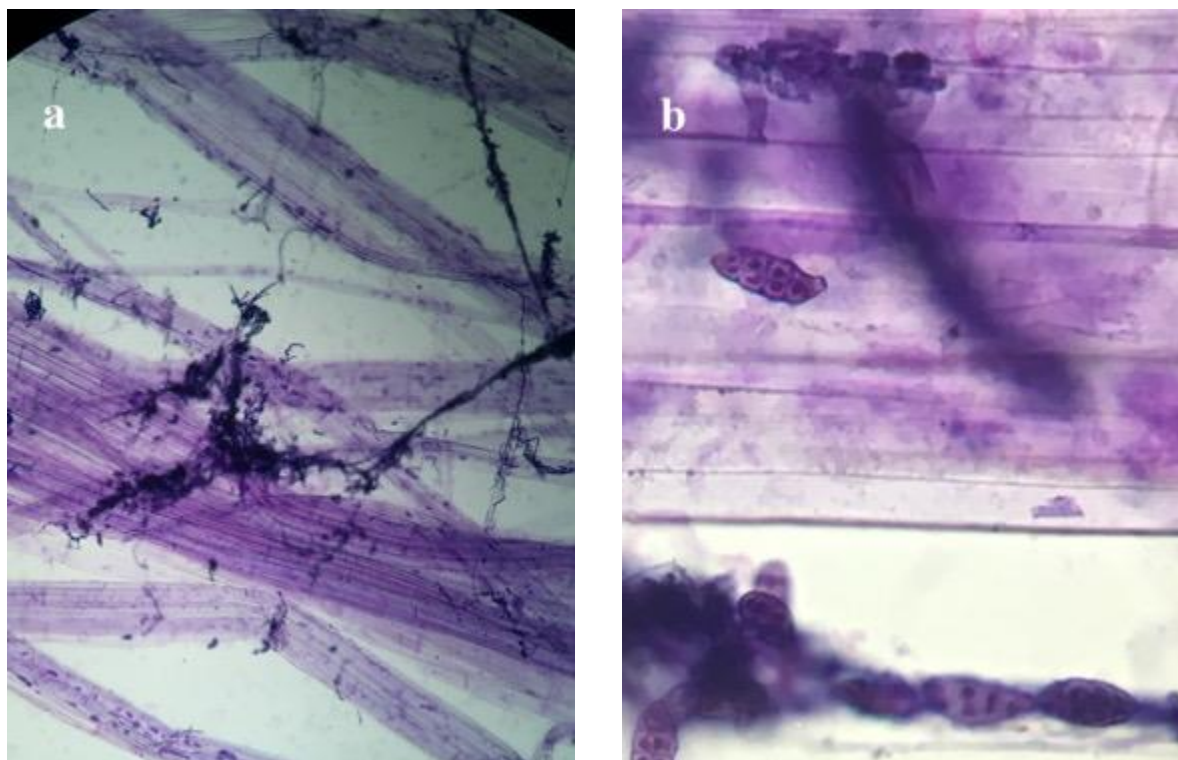


Figura 15. a: plàntula de *D. sanguinalis* infectada amb un fong diferent a *U. syntherismae*. Imatge realitzada a 100 augments. b: plàntula de *D. sanguinalis* infectada amb un fong diferent a *U. syntherismae* (mateixa plàntula). Imatge realitzada a 400 augments. (Autora: Rosa Reverter).

4.2.2. Anàlisi de la variància

A continuació (Taula 6) es mostra l'anàlisi de la variància de la proporció de plàntules infectades considerant les fonts de variació mida de les espiguetes i tipus de germinació.

Taula 6. Anàlisi de la variància dels factors tipus de germinació, mida de les espiguetes i la interacció entre aquests dos factors a partir de les dades de la Taula 5. La transformació aplicada va ser arcsinus de la proporció de plàntules infectades, en tant per u.

Factor	Graus de llibertat	Suma de quadrats (III)	Quadrats mitjans	Valor F	P > F
Mida	1	0,8904	0,8904	6,70	0,0185
Tipus de germinació	1	0,5580	0,5580	4,20	0,0553
Mida * tipus de germinació	1	0,2098	0,2098	1,58	0,2249

Atès que el valor $-p$ obtingut en el cas de la mida de les espiguetes és inferior a α ($\alpha = 0,05$), amb un valor de 0,0185, es pot dir que existeixen diferències significatives entre les diferents mides de les espiguetes en relació a la proporció de plàntules infectades pel fong.

Pel que fa al tipus de germinació i la interacció de la mida de les espiguetes i el tipus de germinació, com que el valor $-p$ és més elevat que α , $P = 0,0553$ i $P = 0,2249$ respectivament, no es pot concloure que hi hagi diferències significatives en la proporció de plàntules infectades quan aquesta es troba en funció del factor tipus de germinació i del factor d'interacció entre el tipus de germinació i la mida de les espiguetes.

Les dades obtingudes quant al factor germinació no es corresponen amb les obtingudes per Mas & Verdú (2014), on es va poder concloure que existien diferències significatives en la proporció de plàntules infectades segons el factor de germinació; les plàntules amb patró de germinació radicular presentaven una major susceptibilitat a ser infectades que les de patró coleoptilar.

4.3. Seguiment de la germinació de l'assaig B

Aquest assaig, es va realitzar durant 14 setmanes, en el qual hi va haver un total de 6 cohorts. Durant el temps en què es va realitzar l'experiment, es va fer un seguiment de les plàntules que emergien. El número total de plàntules emergides va ser de 32, distribuïdes en les diferents cohorts de manera que en la tercera cohort hi va haver el màxim nombre d'emergències, amb un total de 13 plàntules (veure figura 16).

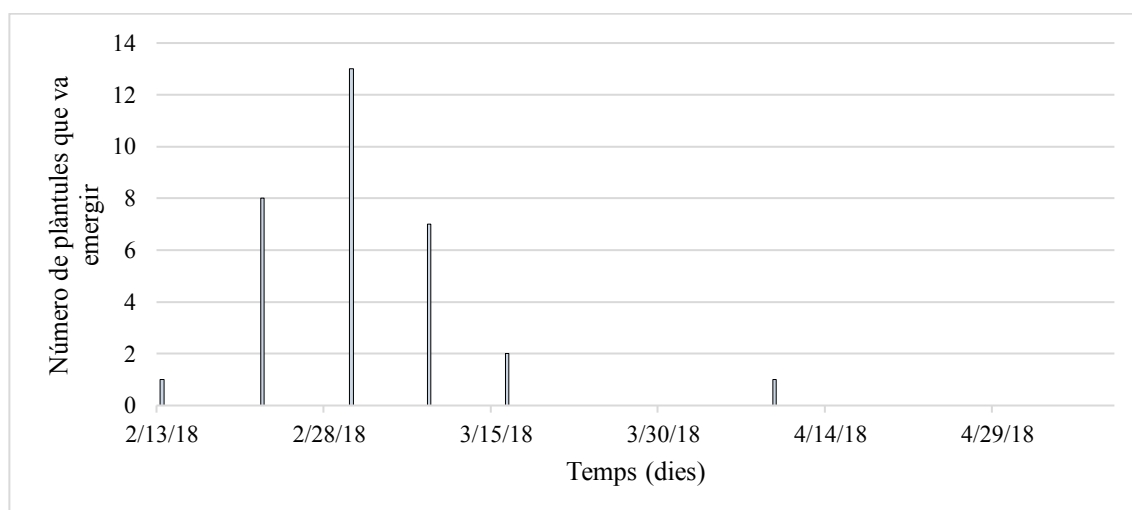


Figura 16. Número de plàntules que van emergir en cadascuna de les cohorts.

Tal com s'ha esmentat en l'apartat 3.4.4., el percentatge de plàntules emergides durant el temps en que es va realitzar aquest assaig va ser només del 15,03%, és per aquest motiu que es va decidir examinar els testos buscant les plàntules que no havien emergit i veure si les espiguetes havien germinat però les plàntules no havien pogut emergir o si les espiguetes ni tan sols havien germinat. El percentatge d'espiguetes que van germinar però no van poder emergir va ser del 53,17% i el d'espiguetes no germinades del 31,80% (Veure Figura 17).

Tant observant els gràfics com els percentatges es pot veure clarament què durant l'assaig moltes espiguetes van germinar però les plàntules no van poder emergir.

En un cas, una de les plàntules situades a 3 cm de profunditat va emergir, amb tot, passada una setmana ja no es podia observar (veure Figura 18). Al realitzar l'examen dels testos, aquesta es va trobar com a espigueta germinada - plàntula no emergida, el més probable és que s'hagués suïcidat. Segons Benvenuti *et al.*, (2001), la profunditat excessiva en el 85% dels casos provoca dormància enlloc de suïcidi en la germinació, per tant aquesta plàntula podria formar part del 15% restant.

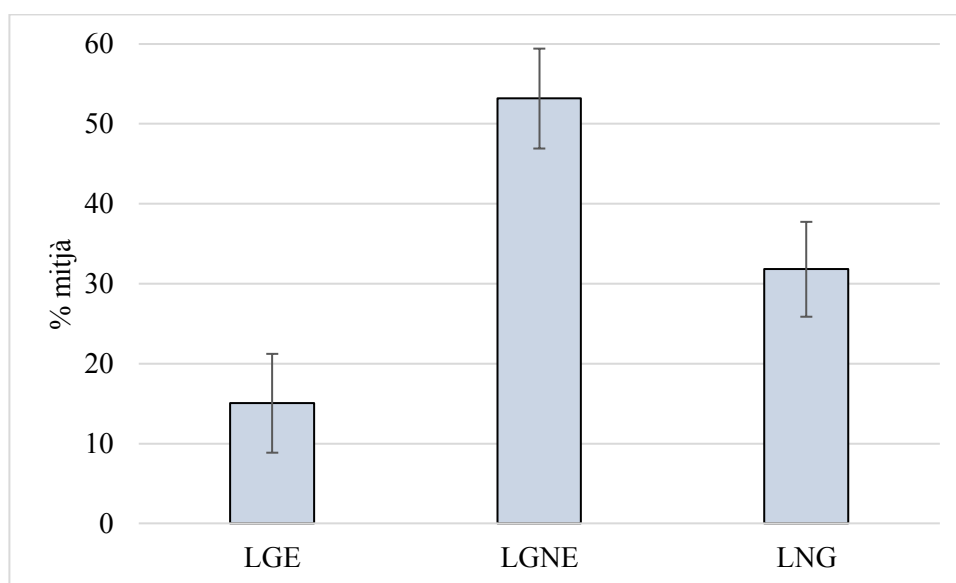


Figura 17. Percentatge mitjà d'espiguetes germinades i plàntules emergides (LGE), espiguetes germinades i plàntules no emergides (LGNE) i espiguetes no germinades (LNG). Les línies verticals corresponen a la desviació estàndard.



Figura 18. a: imatge on es pot veure una plàntula de *D. sanguinalis*, provinent d'una espigueta petita situada a 3 cm de profunditat realitzada el 6-03-2018. b: imatge on es pot observar que la plàntula que havia emergit ja no hi és, fotografia realitzada el 14-03-2018. (Autora: Rosa Reverter).

Es va fer una classificació del percentatge d'espiguetes de cada grup segons quina era la seva mida en el moment de la sembra. En aquesta classificació (veure Figura 19), s'observa una lleugera superioritat en la germinació i l'emergència de les llavors grans respecte les petites. Concretament, es va obtenir un percentatge de LGE grans del 8,35% i petites del 6,68%, de LGNE grans del 24,49% i petites del 24,68% i de LNG grans del 13,38% i petites del 18,43%. Els resultats obtinguts concorden amb altres estudis realitzats en el bròquil (Heather & Sieczka, 1991) i en la prunel·la vulgar (Winn, 1985), on els autors van confirmar que una mida major de les llavors significava una major probabilitat d'emergència de la plàntula.

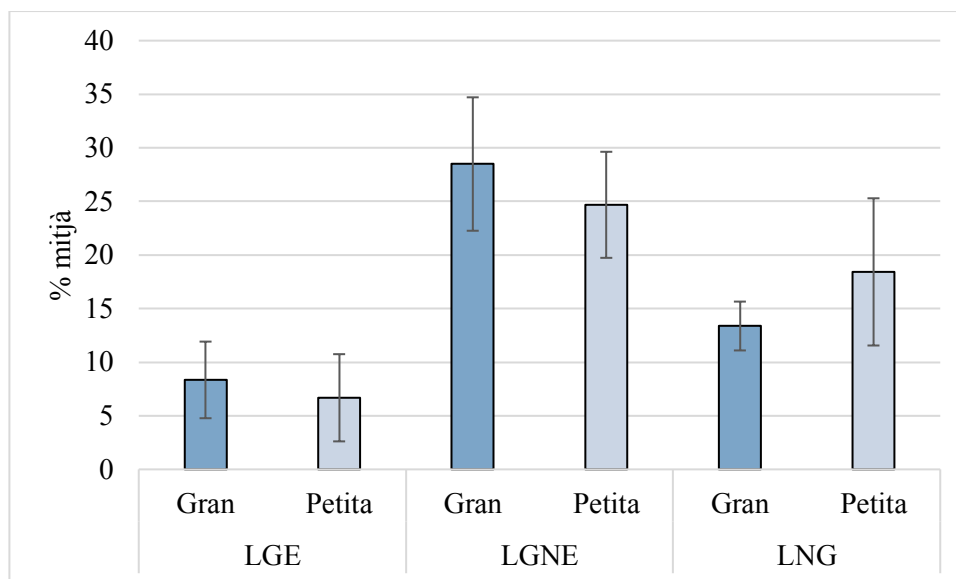


Figura 19. Percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG, segons la mida de l'espigueta i representació mitjançant línies verticals de la desviació estàndard.

Els percentatges de LGE, LGNE i LNG, també es van classificar segons la profunditat d'enterrament de les espiguetes. En aquesta (veure Figura 20), es pot veure que les llavors enterrades a 3 cm de profunditat gairebé no van poder emergir (només van emergir dues plàntules). Benvenuti *et al.*, (2001) en el seu estudi, va veure que la *D. sanguinalis*, si es trobava a 2 cm tardava 7,4 dies en germinar i que el percentatge de germinació era del 60%. En canvi, si la profunditat en què es trobava l'espigueta era de 4 cm tardava 9,6 dies i el percentatge de germinació es reduïa al 35%. Els percentatges obtinguts en aquest cas van ser de LGE a 1 cm del 13,36% i a 3 cm del 1,67%, de LGNE a 1 cm del 24,30% i a 3 cm del 28,87% i de LNG a 1 cm del 12,13% i a 3 cm del 19,68%.

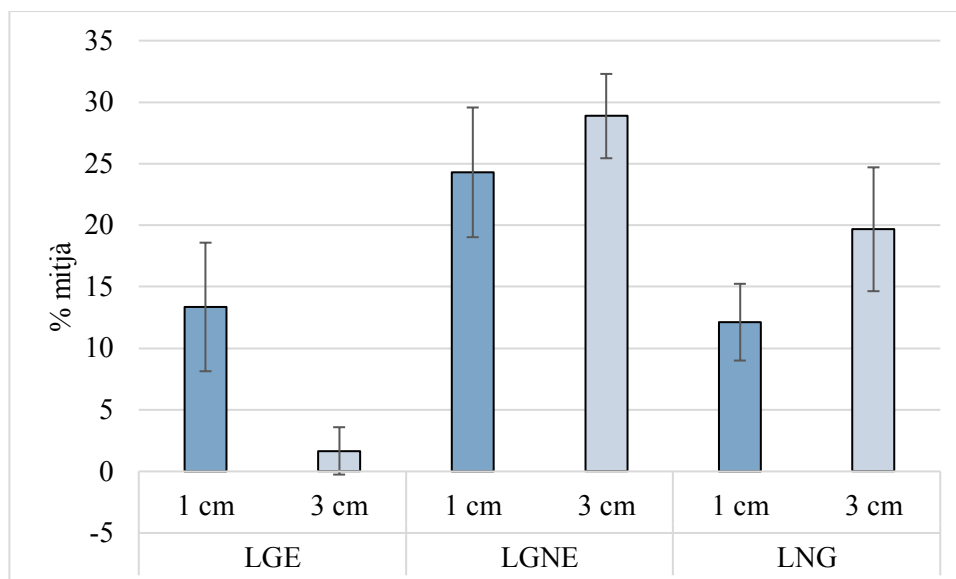


Figura 20. Percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG, segons la profunditat d'enterrament de les espiguetes i les línies verticals que corresponen a la desviació estàndard.

Una altra classificació que es va fer de LGE, LGNE i LNG és segons si les espiguetes havien estat infiltrades amb carbó o es tractava d'espiguetes del grup control. Com es pot observar (veure Figura 21), el nombre de plàntules germinades (LGE) en tots dos casos es bastant similar, però s'ha de tenir en compte que el nombre d'espiguetes del grup control era quatre vegades més petit que el d'espiguetes inoculades. Els percentatges obtinguts en aquest cas van ser de LGE control del 5,85% i inoculades del 9,18%, de LGNE control del 8,79% inoculades del 44,39%, de LNG control del 5,45% i inoculades del 26,35%.

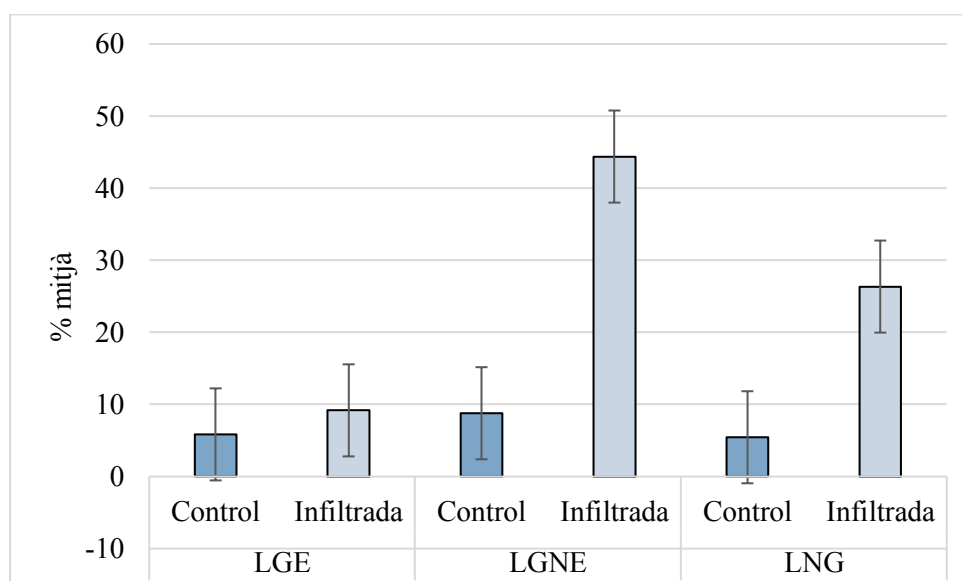


Figura 21. Percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG segons si les espiguetes estaven infiltrades amb *U. syntherismae* o no i representació mitjançant línies verticals de la desviació estàndard.

Tal com s'ha esmentat anteriorment, el número d'espiguetes del grup control era 5 vegades més petit que el d'espiguetes inoculades, és per aquest motiu que es va decidir separar-les i veure quin era el percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG en cada cas, és a dir, observar els percentatges de cada tipus d'espigueta, tenint en compte només el número d'espiguetes totals de cada grup, (48 espiguetes en el grup control i 192 en el grup d'espiguetes infiltrades) (veure Figura 22).

Per tant, tenint en compte només les espiguetes de cada grup, es pot veure que el percentatge d'espiguetes germinades i emergides, tot i ser molt semblant quan es mirava de manera global, resulta força més elevat en les espiguetes del grup control que en les espiguetes inoculades, fet que fa pensar que potser hi ha més mortalitat en el moment de germinar en les espiguetes infectades. En aquest cas, els percentatges obtinguts van ser de LGE control del 29,17% i infiltrades del 11,48%, de LGNE control del 43,75% i infiltrades del 55,55% i de LNG control del 27,08% i infiltrades del 32,97%.

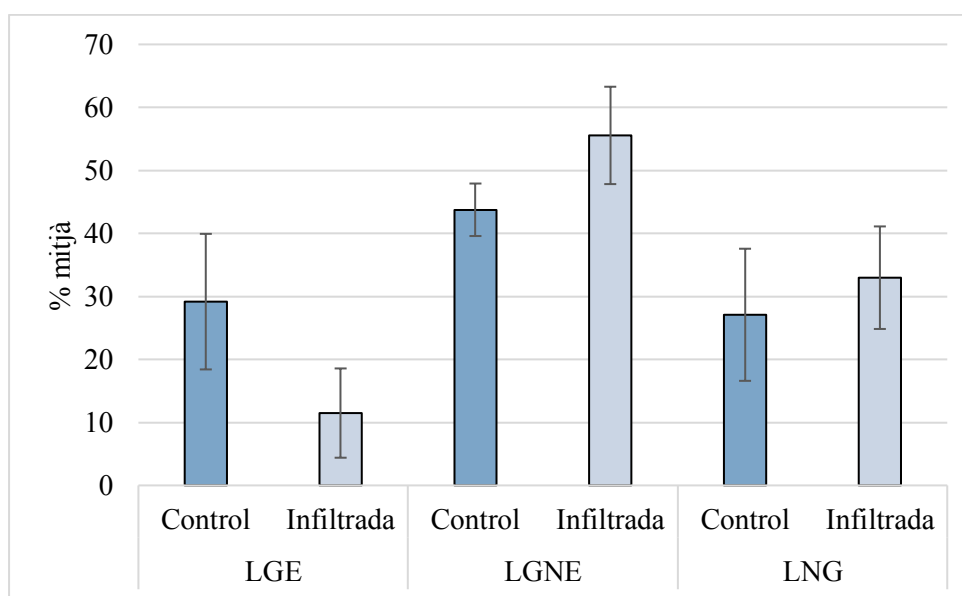


Figura 22. Percentatge mitjà de LGE, LGNE i LNG segons si les espiguetes estaven inoculades amb *U. syntherismae* o no, respecte a elles mateixes i línies verticals que corresponen a la desviació estàndard.

4.4. Anàlisi de la variància de l'assaig B

A continuació (Taula 7), es mostra l'anàlisi de la variància de la proporció de plàntules germinades segons les variables mida de les espiguetes, profunditat i la interacció entre aquestes dues.

Taula 7. Anàlisi de la variància dels factors safata, mida de les espiguetes, profunditat i la interacció entre la mida de les espiguetes i la profunditat. La transformació aplicada va ser arcsinus de la proporció de plàntules infectades en tant per u.

Factor	Graus de llibertat	Suma de quadrats (III)	Quadrats mitjans	Valor F	P > F
Safata	3	0,3040	0,1033	1,11	0,3527
Mida	1	0,0003	0,0003	0,00	0,9561
Profunditat	1	1,5532	1,5532	16,62	0,0001
Mida * Profunditat	1	0,0877	0,0877	0,94	0,3360

En aquest cas, l'únic factor que tenia diferències significatives en la germinació de les plàntules, amb un nivell de significació del 0,05 era la profunditat d'enterrament de les espiguetes, amb valor $-p = 0,0001$. Tal com ja s'ha comentat anteriorment (en l'apartat 4.3), aquesta afirmació coincideix amb el que va dir Benvenuti *et al.*, (2001), sobre la profunditat d'enterrament respecte la germinació de *D. sanguinalis*.

D'altra banda, ni en la mida de les llavors ni en la interacció entre variables es pot descartar que les mitjanes siguin iguals, ja que els valor $-p$ en ambdós casos superen el nivell de significació (valor $-p = 0,9561$ i valor $-p = 0,3360$) per tant, no es pot afirmar que hi hagin diferències significatives entre les diferents mides de les espiguetes i la interacció entre les mides de les espiguetes i les profunditats d'enterrament.

4.5. Dades infecció de l'assaig B

4.5.1. Resultats obtinguts

En aquest assaig, les dades d'infecció obtingudes van ser molt baixes, ja que tal com s'ha vist en l'apartat anterior, hi va haver molt poques plàntules que aconseguissin emergir. D'aquestes, un 36,11% eren plàntules del grup control que tal com ja s'ha esmentat anteriorment, durant l'observació, en cap cas es van trobar plàntules amb hifes, és a dir, cap d'aquestes plàntules es va

infectar. Per tant, només es va obtenir un 9,60% (23 plàntules) de les dades previstes en el disseny de l'assaig. Aquest fet va suposar que no es pogués fer cap anàlisi estadística, ja que la mostra era massa petita.

En les plàntules emergides amb possibilitat d'infectar-se, només hi va haver un 13,04% d'infecció, és a dir només 3 de les 23 plàntules es van infectar (veure Figura 23).

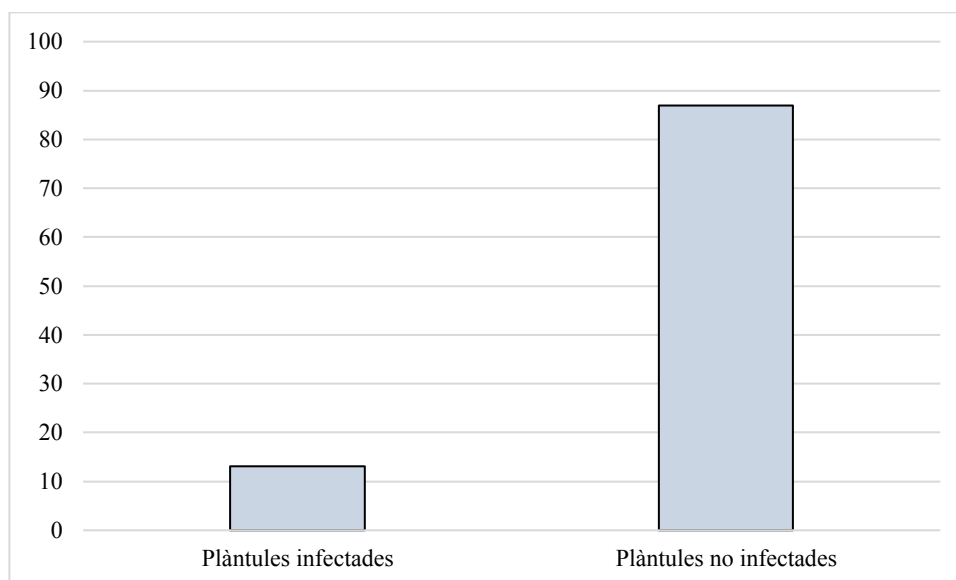


Figura 23. Representació del percentatge de plàntules infectades i plàntules no infectades obtingut a partir de les dades de l'assaig B.

Tal com era d'esperar, degut a què el percentatge de plàntules emergides, era més elevat a les espiguetes que es trobaven enterrades a un centímetre de profunditat, les tres plàntules infectades provenien d'aquesta profunditat d'enterrament d'espiguetes. Les plàntules infectades provenien de la tercera i la quarta cohort. Dues de les plàntules infectades provenien d'espiguetes grans i una d'una espigueta petita. Podria ser que com les espiguetes grans tenen més superfície de contacte, el fong podria tenir més possibilitats d'entrar i infectar la plàntula, però com hi ha poques dades, no podem concloure res sobre la influència de la profunditat d'enterrament ni de la mida de l'espigueta.

5. Conclusions

En primer lloc es pot concloure que tant les espiguetes de *D. sanguinalis* com les espores de *U. syntherismae* emprades en aquest assaig eren viables i a més, que les espiguetes de *D. sanguinalis* no tenien, en general, resistència que impedís al fong entrar a la plàntula i infectar-la, ja que els percentatges d'infecció obtinguts van ser molt alts, amb un valor del 93,60%.

D'altra banda, també es pot afirmar que la mida de la llavor és un factor que influeix en la infecció del fong, atès que existeixen diferències significatives entre les mitjanes d'infecció de les espiguetes de mides grans i petites, essent superiors en les espiguetes petites que en les grans, però no es pot afirmar que el patró de germinació sigui un factor que influeixi en la infecció.

Tot i que a causa de les poques dades obtingudes, no es va poder determinar com influeixen les cohorts, la profunditat d'enterrament i la mida de les espiguetes en la infecció, sí que es va poder determinar que en la germinació de les espiguetes hi influeix la profunditat d'enterrament. Les espiguetes situades a un centímetre de profunditat van germinar un 7,08% més que les que es trobaven a tres centímetres, que en molts casos continuaven en fase de dormància. A més, el nombre de plàntules emergides que s'havien sembrat a 1 cm de profunditat va ser un 7,47% superior al de les que s'havien enterrat a 3 cm.

6. Bibliografia

- Arnon, D. I., Hoagland, D. R. (1940) 'Crop production in artificial solutions and in soils with special reference to factors affecting yields and absorption of inorganic nutrients'. *Soil science*, 50, pp. 463–484.
- Bauer, R., Begerow, D., Oberwinkler, E., Piepenbring, M., Berbee M. L. (2001) 'Ustilaginomycetes', *Systematics and Evolution*, pp 57–83.
- Behrendt, S., Hanf M. (1979) 'Malezas gramíneas en los cultivos agrícolas: su determinación en el estado de no floración. Alemania. Ed. BASF.
- Benvenuti, S., Machia, M., Miele, S. (2001) 'Quantitative Analysis of Emergence of Seedlings from Buried Weed Seeds with Increasing Soil', *Weed Science*, 49, pp 528–535.
- Bolòs, O., Vigo J., Masalles R.M., Ninot J. M. (2005) 'Flora manual dels Països Catalans', 3a ed. Barcelona: Pòrtic.
- Gallart, M., Mas, M. T., Verdú A. M .C. (2009) 'Effects of loose smut on *Digitaria sanguinalis* population depending on seedling emergence period', *Acta Oecologica*, 35, pp. 409–414.
- Heather, D. W., Siczka, J.B. (1991) 'Effect of Seed Size and Cultivar on Emergence and Stand Establishment of Broccoli in Crusted Soil', *JASHS*, 116, pp. 946–949.
- Hurtado, E., Mas, M. T., Verdú, A. M. C. (2009) *XII Congesso da Sociedade Espanola de Malherbologia (SEMh), XIX Congresso da Asociacion Latinoamericana de Malezas (ALAM), II Congresso Iberico de Ciencias de las Malezas (IBCM), Herbologia e Biodiversidade numa Agricultura Sustentavel, Lisboa, Portugal, XII Congreso Sociedad Española de Malherbologia. Instituto Superior de Agronomia.*
- Jauzein, P., Montegut, J. (1983) 'Graminées (*Poaceae*) nuisibles en agriculture', Societé d'éd. "Champignons et nature".
- Johnson, D. A., Baudoin, A. B. A. M. (1997) 'Mode of Infection and Factors Affecting Disease Incidence of Loose Smut of Crabgrass', *Biological Control*, 10, pp. 92–97.

Jorba, M. (2014) 'Variació intrapoblacional de la patogenicitat de *Ustilago syntherismae* en interacció amb *Digitaria sanguinalis*'. Universitat Politècnica de Catalunya.

Mas, M. T., Verdú, A. M. C., Girbal, J. (2006) 'New report of loose smut (*Ustilago syntherismae*) on *Digitaria sanguinalis* in Spain', *Plant Pathology*, 55.

Mas, M. T., Verdú, A. M. C. (2014) 'Within-population variation in resistance of *Digitaria sanguinalis* to *Ustilago syntherismae* resulting from different modes of seed germination and environment', *Plant Pathology*, 63, pp. 140–147.

Recasens, J., Conesa J.A. (2009) 'Malas hierbas en plántula: guía de identificación', Universitat de Lleida.

Tilley, M. A., Walker, L. H. (2002) 'Evaluation of *Curvularia intermedia* (*Cochlibolus intermedius*) as potential microbial herbicide for large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*)', *Biological Control*, 25, pp. 12–21.

Vánky, K. (1994) 'European smut fungi'. Gustav Fischer Verlag.

Verdú, A. M. C., Mas M. T. (2014) '*Digitaria sanguinalis* seedling development pattern: Relationship with seed origin', *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 148, pp. 42–48.

Verdú, A. M. C., Mas M. T. (2015) 'Density-related effects on the infectivity and aggressiveness of sterilizing smut in a wild population of *Digitaria sanguinalis*', *Plant Biology*, 17, pp. 281–287.

Wiederholt, R. J., Stoltenberg, D. E. (1993) 'Resistance of giant foxtail (*Setaria faberi* Herrm.) and large crabgrass (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.) biotypes to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors', *Resistant Pest Management*, 5, pp. 17–18.

Winn, A. A. (1985) 'Effects of Seed Size and Microsite on Seedling Emergence of *Prunella vulgaris* in Four Habitats', *The Journal of Ecology*, 73, pp. 831.

Zhu, Y., Qiang, S. (2004) 'Isolation, Pathogenicity and Safety of *Curvularia eragrostidis* Isolate QZ-2000 as Bioherbicide Agent for Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*)', *Biocontrol Science and Technology*, 14, pp. 769–782.